

(19)日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号
特開平10-73597
(43)公開日 平成10年(1998)3月17日

(51)Int.Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
G 0 1 N 33/543 5 8 3 G 0 1 N 33/543 5 8 3

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平8-231828	(71)出願人 591086706 軽部 征夫 神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地 16
(22)出願日	平成8年(1996)9月2日	(71)出願人 591258484 株式会社エイアンドティー 東京都日野市日野320番地の11
		(71)出願人 000003182 株式会社トクヤマ 山口県徳山市御影町1番1号
		(72)発明者 岩田 恵助 埼玉県久喜市青毛1192-2
		(74)代理人 弁理士 大島 正孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法

(57)【要約】

【課題】迅速に、しかも高感度で免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法を提供すること。

【解決手段】担体に抗原もしくは抗体を感作した試薬を用いて、免疫学的凝集反応により免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法であって、該反応系に交流及び／又は直流に由来する微小電圧を印加する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体に抗原若しくは抗体を感作した試薬を用いて、免疫学的凝集反応により免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法であって、該反応系に交流及び／又は直流に由来する微小電圧を印加することを特徴とする方法。

【請求項2】 微小電圧は反応系が電気分解を実質的に起こさない電圧である請求項1の方法。

【請求項3】 担体の平均粒子径が0.01～1μmである請求項1の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は担体粒子を用いた免疫学的凝集反応により、免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法に関する。更に詳しくは、該反応系に交流及び／又は直流に由来する微小電圧を印加することにより、免疫学的反応性物質を迅速且つ簡便に、しかも高感度で検出又は測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫学的反応性物質は、免疫学的凝集反応により、不溶性凝集塊を形成するのでこれを検出することにより、免疫学的反応性物質を検出又は測定することが可能である。免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法として、例えば酵素免疫測定法、放射線免疫測定法が従来から用いられている。これらの方法は高感度であり精度も高い。しかし、酵素や放射線を使用するため試薬が不安定であることや保管・保存上の規制があることから、測定において細かい配慮や技術、特別な設備等が要求されるので、より簡便な方法が求められていた。また、これらの方法は測定に時間を要するため、緊急検査においては対応が困難とされ、高感度且つ迅速な方法が盛んに研究されるようになった。

【0003】1970年以降、ラテックス、リポソーム等の担体を用いた免疫学的凝集反応を測定する方法として光学的分析法（比濁法やカウンティング法）が開発されている。これら免疫学的凝集反応は、一般に攪拌翼等で攪拌されることにより開始され、37℃～45℃の温度下で行われる。このとき測定（反応）に要する時間は5～20分である。これは酵素免疫測定や放射線免疫測定に比べ迅速であるが、測定感度・特異性等において、段階的に改善されつつあるものの前記方法に劣り、応用範囲が限定される。

【0004】該反応系に直流水素や交流電圧を印加することによって、免疫学的凝集反応を迅速に、しかも高感度で測定する方法が知られている。例えば民谷らによるBiosensors、3(3)、139-146頁(1988)には、ヒト免疫グロブリンGを1.0μmラテックス粒子に結合させた試薬と免疫グロブリンGを電極を備えたセルにて混合後、波高値200V(電界強度200V/mm)の直流水素電圧を印加して、10分後に5

0%の凝集度が得られたと記載されている。また、特開平7-83928号公報では、10mM以上の塩の共存下に5～50V/mmの電界強度になるように交流電圧を該反応系に印加する方法を提案している。いずれも、これら変動する電圧を印加することによって、担体粒子のパールチェイン化により、凝集塊の形成を促進させる効果による。

【0005】

【発明が解決すべき課題】しかしながら、免疫学的凝集反応に汎用されているラテックス試薬（粒子径1μm未満）では、パールチェイン化は困難であり、高感度化は期待できない。前記特許公開公報にも、好ましい担体粒子の平均径は0.5～10μmと記載されている。本発明者らは、一般に高感度で迅速且つ簡便であると評価されているラテックス比濁法に使用されている0.1～0.5μmの担体粒子からなる試薬を用いて、従来法よりも更に迅速に、しかも高感度で免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法を知見し、本発明に到達した。

【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、担体に抗原若しくは抗体を感作した試薬を用いて、免疫学的凝集反応により免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法であって、該反応系に交流及び／又は直流に由来する微小電圧を印加すること特徴とする方法である。本発明において、免疫学的凝集反応とは、抗原抗体反応、特異的レセプターとの反応等を利用した方法であり、定性法及び定量法の両方を含むものである。本発明における免疫学的反応性物質は、上記の免疫学的凝集反応によって、ラテックス、リポソーム等を担体として使用する凝集法で測定され得る物質から選択できる。例えばCRP、HBs抗原、HBs抗体、HCV抗体、HIV抗体、TP抗体等の感染症マーカー、D-ダイマー、プロテインC、プロテインS、ATIII等の凝固線溶系マーカー、 AFP、CEA、CA19-9等の腫瘍マーカー、TSH、プロラクチン、インスリン等のホルモン、β2m、ミオグロビン、ミオシン等の組織成分、DNA等の核酸が挙げられる。また、検出可能な濃度は、概ね0.05ng/ml～50μg/ml、好ましくは0.1ng/ml～10μg/mlである。感作する抗原若しくは担体としては、上記免疫学的反応性物質を免疫学的に認識し得る抗原又は抗体を用いる。

【0007】本発明の担体粒子としては、ラテックス、リポソーム、金コロイド等が挙げられるが、好ましくはラテックス粒子である。ラテックス粒子としては、一般に免疫学的凝集法に用いられているものが使用できる。担体粒子の平均径は、ラテックス粒子の場合、0.01～1μmが好ましい。より好ましくは0.05～0.5μmである。最も好ましくは0.1～0.3μmである。平均径が1μmを超えると粒子のブラウン運動等が起こりにくくなるので好ましくない。ラテックス粒子への抗体

若しくは抗原の感作は、例えば従来周知の方法で吸着又は結合させることにより実施することができる。

【0008】本発明の微小電圧は交流及び／又は直流に由来するものであり、より好ましくは交流電圧である。直流電圧は電気分解を容易に誘発するので、指摘条件の範囲が狭まる。また、反応系が電気分解を実質的に起こさない範囲の電圧、例えば反応系の電気伝導度が1.7.4 mS/cm(生理食塩水相当)のとき、電界強度7.8 V/mm以下の交流電圧(周波数10 KHz)である。交流電圧の印加時間は、反応系が電気分解を実質的に起こさない範囲でなるべく長時間印加した方が好ましく、十数秒～数分間である。より好ましくは30秒～2分間の印加である。しかし、電気分解の起因は、反応系試液の電気伝導度及び印加電圧、電極の材質、面積、印加時間等の要因で異なるため、前記した交流電圧の電界強度、印加時間は実験条件により変動する。

【0009】本発明の交流の周波数は、検討した範囲内では免疫学的凝集反応の速度に大きく影響しないが、好ましくは1 KHz～1 MHzの周波数である。本発明における交流電圧の波形は連続波、パルス波のいずれであってもよく、また任意の形状とし得るが、好ましくは正弦波、方形波、矩形波である。

【0010】本発明において試薬に微小電圧を印加する代表的な装置、並びに免疫学的反応性物質を検出又は測定する代表的な測定装置は、例えば図1(または図5)に示すように、直流パルス電圧、交流電圧、直流電圧等の任意電圧が印加できる電源装置、分光光度計用セルに電極を貼り付けた電極付きセル、電圧、周波数、パルス幅をモニタするためのオシロスコープ、濁度測定を行う分光光度計等からなる。電源装置としては、任意のパルス発生装置、例えば市販のファンクションジェネレータや細胞刺激装置等を使用することができる。分光光度計用セルとしては、市販のガラスセル、プラスチックセル等を用いることができ、電極材料としては、白金、ニッケル等を用いることができる。

【0011】免疫学的反応性物質の存在を検出又は測定する方法としては、検体を緩衝液を主成分とする溶液に加え、室温～37℃で、0.5～3分間処理し、次いで担体に抗原若しくは抗体を感作した試薬の懸濁液を加えた後、或いは上記試薬の懸濁液を緩衝液を主成分とする溶液に加え、室温～37℃で、0.5～3分間処理し、次いで検体を加えた後、微小電圧を印加しながら若しくは微小電圧を印加した後、例えば前出の測定装置を用いて濁度変化量を求める方法により実施される。後者の試薬を含む溶液に検体を加える方法では、微小電圧を印加しながら検体を加えた後に濁度変化を測定することもできる。

【0012】本発明に用いられる試薬は、通常、水系媒体中に分散して用いられる。試薬を含む水系媒体中の塩濃度は特に規定されないが、好ましくは電気伝導度0～

1.00 mS/cmである。より好ましくは2～6.0 mS/cmである。塩としては、例えば塩化カリウム、塩化ナトリウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等が挙げられるが、特に塩化カリウム、塩化ナトリウムが好ましい。試薬を含む水系媒体の組成としては、当業者によく知られている組成が使用できる。例えばアルブミン等のタンパク、ポリエチレンジリコール、ツイーン、トライトン等の界面活性剤、塩化コリン等の塩化物、アルギニン、アスパラギン等のアミノ酸類、アジ化ナトリウム等の防腐剤等が添加されていてもよい。反応系の電気伝導度は小さい方が好ましく、電気伝導度が小さくなると該反応系に印加できる電界強度を大きくできるので免疫学的凝集反応の促進効果が得られ易く望ましい。

【0013】

【実施例】以下、実施例及び比較例をもって本発明を詳細に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0014】実施例1 交流電圧特性／印加電圧電界強度

(1) AFPラテックス試薬の調製

5mgの抗AFP抗体を9.5mlのグリシン緩衝液(以下GBSと略す)に溶解し、0.5mlのラテックス(粒子径0.22μm、固形分10%懸濁液)を加え、室温で2時間攪拌した後、感作したラテックス懸濁液を遠心分離して上清を除去した。沈殿を33mlの0.2%BSA-GBSに懸濁させ、AFPラテックス試薬を調製した。

【0015】(2) 交流電圧印加装置

図1の実験装置を使用して、オシロスコープにより電極間にかかる電位の条件を設定して交流電圧を印加した。(電極間の距離3mm)

(3) 測定方法

電極を張り合わせたガラスセルに0.2%牛血清アルブミンを含有するリン酸緩衝液(15mMリン酸、0.4%ポリエチレンジリコール6000、2%塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム含有、以下0.2%BSA-PBSと略す)600μl、AFPラテックス試薬300μlを分注し、交流(AC)電圧(0V～±7.5V、周波数10 KHz、正弦波)を2分間印加した。印加開始30秒後に、検体60μlを添加した後、直ちに分光光度計(日立U-3200)を用いて濁度変化のタイムコースを測定し、5分間の濁度差(ΔOD 572 nm)を求めた。なお、0.2%BSA-GBSを用いて、AFP標準を希釈して AFP濃度0～2.5ng/mlの検体を調整し測定に使用した。印加電圧の電界強度を0V、±1V、±3.5V、±4.5V、±7.5Vに設定して、各濃度の検体を測定した。

【0016】(4) 結果

結果を表1および図2に示した。図2から明らかのように、本発明によれば、従来法(印加電圧0V)に比べ、

免疫学的凝集反応を促進化させて高感度に免疫学的反応性物質を検出又は測定することが可能であることが分かる。また、印加電圧の電界強度を大きくした方が、免疫

学的凝集反応をより促進化できることが分かる。

【0017】

【表1】

A F P (ng/ml)	A C 印加電圧による $\Delta O D$ 値(カウント)				
	0 V	1 V	3.5 V	5.5 V	7.5 V
0	16	13	21	18	25
1.25	19	19	31	38	52
2.5	23	26	44	48	68

【0018】実施例2 交流電圧特性／周波数

(1) A F P ラテックス試薬の調製

実施例1と同様して、A F P ラテックス試薬を調製した。

(2) 交流電圧印加装置

実施例1と同様の装置で測定した。

(3) 測定方法

周波数10Hz～100KHzの交流電圧(正弦波)を

電界強度±6Vとなるように印加し、実施例1と同様にして、各検体の周波数に対する濁度変化を測定した。

(4) 結果

結果を表2および図3に示した。図3に示した結果から、交流周波数は1～100KHzの間では、免疫学的凝集反応を一様に促進化できることが分かる。

【0019】

【表2】

A F P (ng/ml)	各周波数による $\Delta O D$ 値(カウント)				
	0.01KHz	0.1KHz	1KHz	10KHz	100KHz
0	180	75	19	28	15
1.25		63	44	41	46
2.5			58	58	59

【0020】実施例3 交流電圧特性／印加時間

(1) A F P ラテックス試薬の調製

実施例1と同様して、A F P ラテックス試薬を調製した。

(2) 交流電圧印加装置

実施例1と同様の装置で測定した。

(3) 測定方法

電界強度±7.5V、周波数10KHzの交流電圧(正

弦波)を0～4分間印加し、実施例1と同様にして、各検体の印加時間に対する濁度変化を測定した。

(4) 結果

結果を表3および図4に示した。図4に示した結果から、交流電圧の印加時間を長くした方が、免疫学的凝集反応をより促進化できることが分かる。

【0021】

【表3】

A F P (ng/ml)	各印加時間による $\Delta O D$ 値(カウト)				
	印加なし	0.5分間	1分間	2分間	3分間
0	18	20	23	25	54
1.25	19	30	45	52	60

【0022】実施例4

(1) A F P ラテックス試薬の調製

実施例1と同様して、A F P ラテックス試薬を調製した。

(2) 直流電圧印加装置

図5の実験装置を使用して、オシロスコープにより電極間にかかる電位の条件を設定して直流電圧を印加した。

(電極間3mm)

(3) 測定方法

電極を張り合わせたガラスセルに0.2%BSA-PB S600μl、A F P ラテックス試薬300μlを分注し、直流電圧1Vを50秒間印加した。印加開始10秒

後に、検体60μlを添加した後、直ちに分光光度計(日立U-3200)を用いて濁度測定し、更に5分後

に搅拌した後、濁度測定を行いうる分間の濁度差($\Delta O D$)

572nm)を求めた。なお、0.2%BSA-GB Sを用いて、A F P 標準を希釈してA F P 濃度0～1.25ng/mlの検体を調整し測定に使用した。

(4) 結果

結果を表4および図6に示した。図6に示した結果から、本発明方法によれば、従来法(印加電圧0V)に比べ免疫学的凝集反応を促進させ、高感度に免疫学的反応性物質を検出又は測定することができる。

【0023】

【表4】

A F P (ng/ml)	△OD 値(カウント)	
	直流印加	従来法
0	13	16
0.65	115	21
1.25	185	20

【0024】

【発明の効果】本発明によれば、従来の測定方法よりも短時間に、しかも高感度で免疫学的反応性物質を検出又は測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例で使用した交流電圧印加実験装

置の概略図である。

【図2】ヒトAFP濃度、交流電圧の印加と濁度変化との関係を表したグラフである。

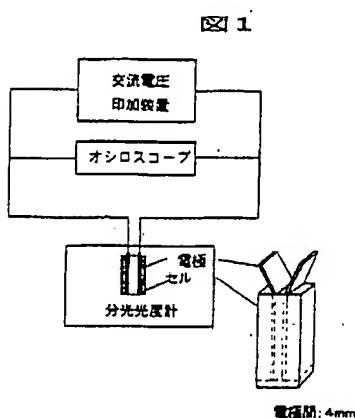
【図3】ヒトAFP濃度、交流電圧の周波数と濁度変化との関係を表したグラフである。

【図4】ヒトAFP濃度、交流電圧の印加時間と濁度変化との関係を表したグラフである。

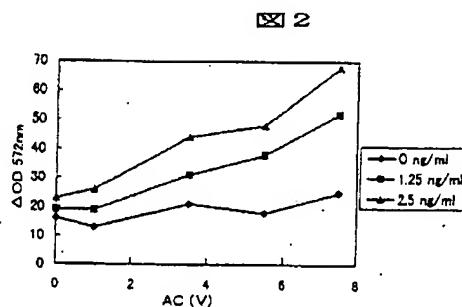
【図5】本発明の実施例で使用した直流電圧印加実験装置の概略図である。

【図6】直流電圧印加によるヒトAFP濃度と濁度変化との関係を表したグラフである。

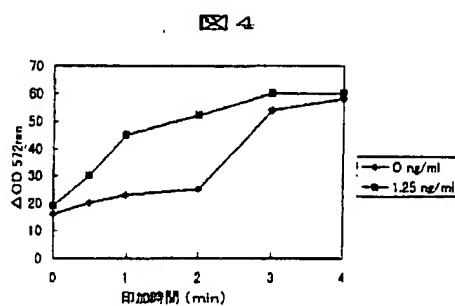
【図1】



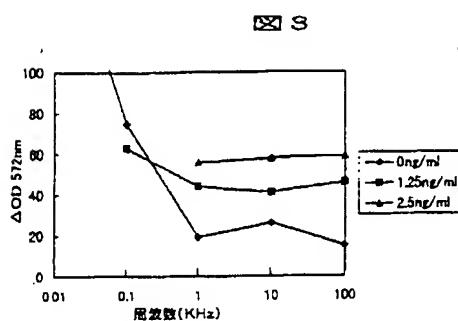
【図2】



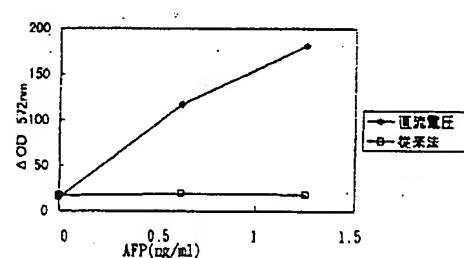
【図4】



【図3】

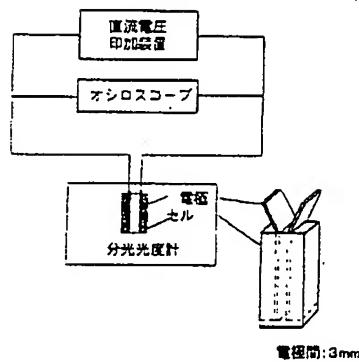


【図6】



【図5】

図5



フロントページの続き

(72)発明者 吉村 佳典
茨城県つくば市千現1-13-7 イーグル
1 201号

(72)発明者 軽部 征夫
神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16